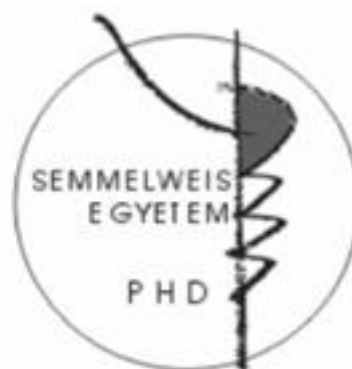


A kalciumpermeábilis humán P2X₄ és TRPV6 ioncsatornák működése és gátlása

Doktori tézisek

Balázs Bernadett Éva

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zsembery Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Zelles Tibor egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Szentesi Péter tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Riba Pál egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Fodor János, Ph.D.

Budapest
2014

BEVEZETÉS

Az ioncsatornák a sejtmembránt átérő ún. transzmembrán fehérjék, amelyek az ionok számára átjárható hidrofil béléssű pórusokat képeznek, melyeken keresztül az ionok passzív transzporttal jutnak át a sejtmembránon. Mivel a transzport sebessége meglehetősen nagy, így másodpercenként akár 10^8 ion is átjuthat a csatornán.

A kalcium-homeosztázis fenntartása nagyon fontos, hiszen a kalcium számos élettani folyamatban elengedhetetlen szerepet tölt be. Ezek közé tartozik például az immunválasz, az izomkontrakció, vagy a hormonszekréció szabályozása. Felnőtt emberben a kalcium összmennyisége hozzávetőlegesen 1 kg. A teljes kalcium kb. 99%-a a csontokban található, a test kalciumtartalmának kevesebb mint egy százaléka pedig az extra- és az intracelluláris térben van jelen. A kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]$) mintegy tízezerszer magasabb az endoplazmás retikulumban, vagy az extracelluláris térben, mint a citoszólban. A legtöbb sejtben a citoszólikus $[Ca^{2+}]$ 50-100 nM között van, míg az ER-ban és az extracelluláris folyadékban hozzávetőleg 1,2 mM. Az extracelluláris térből történő kalciumbeáramlás mellett az intracelluláris raktárakból történő kalcium felszabadulás is növelheti a citoplazma $[Ca^{2+}]$ -ját, amely többnyire heterotrimer G-fehérjéhez kapcsolt plazmamembrán receptorok, valamint a tirozin kináz receptorok stimulációján keresztül valósulhat meg. E szignalizációban fontos szerepet kapnak a foszfolipáz C (PLC) enzim különböző izoformái. A foszfolipáz C enzim a sejtmembrán inozitol-biszfoszfát molekulájának hasításával inozitol 1,4,5-triszfoszfátot (IP_3) és diacilglicerint (DAG) hoz létre. A DAG a protein kináz C (PKC) aktivátora, míg az IP_3 az ER membránján található IP_3 receptor csatornákhöz kötődve kalcium kiáramlást okoz az ER-ból a citoplazmába. A citoplazmatikus kalcium koncentráció tranziens emelkedését követően a Ca^{2+} -ot vagy aktív transzportfolyamatok távolítják el a sejtől, vagy visszavételre kerül az ER-ba. A plazmamembrán kalcium ATP-áz (PMCA) az elektrokémiai grádienssel szemben az extracelluláris térbe juttatja ki a Ca^{2+} -okat. A Na^+/Ca^{2+} (NCX) egy Ca^{2+} -t cserél 3 Na^+ -ra, vagy a $Na^+/Ca^{2+}-K^+$ (NCKX) egy Ca^{2+} -t és egy K^+ -ot cserél négy Na^+ -ra. Szintén az elektrokémiai grádienssel szemben a szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) az intracelluláris raktárakba pumpálja vissza a kalciumot a citoszólból.

A sejt felszínén található nukleotid receptorokat purinoceptoroknak nevezték el. A purinoceptoroknak két fő csoportját különböztetjük meg; a P1 és a P2 receptorokat. A hét

transzmembrán domént tartalmazó P1 receptor család endogén ligandja az adenozin. A P2 receptorok alapvetően ATP, ADP, UTP és UDP által aktiválhatóak és két csoportra oszthatóak. A P2X ionotróp receptorok ATP-függő ioncsatornaként funkcionálnak, míg a P2Y receptorok hét transzmembrán doménnel rendelkeznek, és heterotrimer G-fehérjék közvetítik az őket stimuláló agonisták hatásait.

A P2X receptoroknak hét altípusát különböztetjük meg (P2X₁-P2X₇). Az ATP-által vezérelt P2X ionotróp receptorok két transzmembrán doménből állnak, egy N- és C-terminális régiót tartalmaznak a citoplazmában és nagy extracelluláris hurokkal rendelkeznek. Az ATP kötődése az extracelluláris domén megfelelő helyére konformációváltozást indukál, amely egy nem-szelektív kation-csatorna nyitásához vezet. A P2X ionotróp receptorok alegységei homo- vagy heterotrimer formába rendeződhetnek. A P2X₄ receptor csatornák nagyfokú kalciumpermeabilitással rendelkeznek, mely a sejtmembrán depolarizációja mellett emeli az [Ca²⁺]_i-t is, mely aktiválja a kalcium-szenzitív intracelluláris folyamatokat. Mindazonáltal a P2X₄ receptorok vizsgálatát megnehezíti a specifikus inhibitorok hiánya. Valójában a P2X₄ receptorok inszenzitívek a nem-szelektív P2X receptor gátlószerek iránt mint amilyen például a suramin és a PPADS. A TNP-ATP nem specifikus módon gátolja a P2X₄ receptorokat. A benzodiazepin-származék, 5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro [3,2-e]-1,4-diazepin-2-one (5-BDBD) P2X₄ receptorokat gátló hatását vizsgálták korábban, és az IC₅₀ érték közel 0,5 µM-nak adódott. Mindazonáltal ezek az eredmények szabadalmi védelem alatt állnak, így nem hozzáférhetőek. Jelen munkánkban megvizsgáltuk az 5-BDBD hatását a heterológ módon expresszált humán P2X₄ receptorokon HEK-293 sejtekben.

Több mint negyven évvel ezelőtt Cosens és Manning megfigyelték, hogy a mutáns ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) retinájában hosszú ideig tartó fénymegvilágítás hatására Ca²⁺ permeábilis ioncsatornák aktiválódnak, mely fenntartott receptorpotenciált eredményez. Innen ered a két évtizeddel később leírt tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák elnevezése. A TRP szupercsaládnak hét fő alcsaládját különböztetjük meg: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) és a TRPN (nem mechanoreceptor). Nem meglepő módon a TRP csatornák közül a TRPV5 és a TRPV6 rendelkezik a legnagyobb Ca²⁺-szelektivitással, (P_{Ca}/P_{Na} értékük meghaladja a 100-at). Következésképpen, egyedülállóak a TRP szupercsaládban az intracelluláris kalciumszabályozásban betöltött szerepük révén.

A TRPV6 receptor 725 aminosavból épül fel, hat transzmembrán doménből áll, és intracellulárisan N- és C terminális régióval rendelkezik. A TRPV6 fehérjéről azt feltételezték, hogy része a kalcium által aktivált plazmamembrán kalciumcsatornának. A TRPV5, valamint a TRPV6 csatornák homo- vagy heterotetramer formába rendeződhetnek. A duodenumban és a placentában főként TRPV6 csatornákon keresztül zajlik a Ca^{2+} reabszorpció. A vesetubulusok hámsejtjeiben történő Ca^{2+} reabszorpció a TRPV5 és TRPV6 csatornákon keresztül történik. A TRPV6 fehérje működésének vizsgálatát nehezíti az a körülmény, hogy jelenleg a csatornának nincs specifikus és hatékony gátlószere. Jelen munkánkban megvizsgáltuk az IP_3 receptor és a raktár vezérelt Ca^{2+} csatornák gátlószereként ismert 2-APB hatását a TRPV6 csatornákon.

CÉLKITŰZÉS

1. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a heterológ módon expresszált humán P2X₄ purinerg receptor csatornák működését HEK-293 sejtekben. Tanulmányozni kívántuk továbbá a benzodiazepin származék, 5-BDBD gátló hatását a humán P2X₄ receptorokon az intracelluláris kalciumkoncentráció változásának nyomon követésével és a teljes-sejt ionáramok detektálásával.

2. További célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a heterológ módon expresszált humán TRPV6 csatornák működését HEK-293 sejtekben. Arra is kerestük a választ, hogy a belső raktár vezérelt Ca²⁺ csatorna gátlószereként ismert 2-APB hogyan befolyásolja a hTRPV6 csatornák működését.

MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Kísérleteinkhez humán embrionális vese (HEK)-293 hámsejtvonalat használtunk. A sejteket műanyag szövettényesztő edényben 5% borjúsavót (FBS), 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó DMEM/Ham's F-12 (1:1 v/v) médiumban tenyésztettük. A sejteket 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-os sejtenyésztő inkubátorban tartottuk fenn. A passzálás 90-95%-os konfluencia elérésénél történt.

Konstrukt készítés

A humán P2X₄R-t humán cDNS-ből amplifikáltuk. Az amplifikált terméket a pmCherry-N1 vektor BglII és EcoRI resztrikciós helyeire szubklónoztuk. A humán P2X₄ receptorok izoformája 3-as típusú. A humán TRPV6-ot cDNS-ből amplifikáltuk. Az amplifikált terméket SacII és XhoI segítségével tettük át a pTagRFP-C1 vektorba.

Tranziens transzfekció

A transzfekció előtti napon, a sejteket 40 mm-es műanyag Petri-csészékben lévő, poli-D-lizin bevonatú, kerek, üveg tárgylemezekre (25 mm átmérő) szélesztettük, tárgylemezenként 500.000 sejtszámmal. A sejtek transzfekcióját 16-24 óra elteltével pmCherry-N1-hP2X₄ DNS-el és TurboFectTM transzfekciós reagenssel végeztük el szérum-mentes médiumban, valamint pTagRFP-C1-TRPV6 és Lipofectamine 2000 nevű transzfekciós reagenst használtunk. A transzfekciós médiumot 4 óra múlva antibiotikum-mentes médiumra cseréltük le.

A pmCherry-N1-hP2X₄-et és a pTagRFP-C1-hTRPV6 expresszáló HEK-293 sejtklónok létrehozása

A transzfekciót követő napon a médiumot szelekciós antibiotikumot tartalmazó tápoldatra cseréltük. A túlélő sejteket tripszinezttük, és újraszélesztettük 96-lyukú lemezre. A hígítást úgy készítettük el, hogy 1 lyukba 1 darab sejt kerüljön. A pirosan fluoreszkáló sejtkolóniák, mint a hP2X₄-et és a hTRPV6-ot expresszáló pozitív klónok, fluoreszcens mikroszkóppal kerültek kiválasztásra.

Sejtfelszíni biotiniláció és western blot

A P2X₄-et és TRPV6-ot kifejező HEK-293 sejtklónokat poli-D-lizinnel előkezelt, 1.000.000 sejt/tárgylemez sűrűségben tettük ki 60 mm átmérőjű tenyésztőedényekbe. A sejteket, 24 órával a kitapadás után, jéghideg PBS-Ca-Mg oldatban mostuk, ezt követte a plazmamembrán-fehérjék biotinilációja 4°C-os hőmérsékleten. A felesleges biotin eltávolítottuk, majd a sejteket háromszor mostuk PBS-ben. Végül a sejteket lízis pufferben lizáltuk és a lizátumot centrifugálással tisztítottuk meg. A fehérje koncentrációját DC Protein Assay módszerrel határoztuk meg. A sejt lizátum azonos mennyiségű fehérjét tartalmazott (1,33 mg/ml), amelyhez streptavidin-agaróz gyöngyöket kevertünk egy éjszakán át, 4°C-on. A gyöngyöket egymás után háromszor mostuk. A biotinilált felszíni fehérjéket 95°C-on főztük 4x Laemmli pufferben. Az intracelluláris frakcióból kapott fehérjéket 95°C-on 5 percen át főztük 4x Laemmli pufferben.

A P2X₄-et expresszáló mintáinkat 10%-os SDS-PAGE gélen futattuk, amelyre 40 µl fehérjét vittünk fel. Towbin pufferben transzferáltuk a mintákat PVDF membránra. A membránok blokkolását szobahőmérsékleten végeztük el egy órán keresztül PBS-ben oldott 5%-os tejporoldattal. A mintákat a megfelelő primer antitestet tartalmazó (Clontech, 632543) blokkoló oldatban inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on, majd háromszor mostuk foszfátpuffer Tween 20 (PBST) oldatban. A szekunder antitest tormaperoxidázzal (HRP) konjugált antitest volt. Folyamatosan PBST-ben történő háromszori mosást végül PBS-es mosás követte, a detektálásra kemilumineszcens (ECL) módszert használtunk. Kontrollként az anti-mCherry antitesttel jelölt membránt sztrippeltük és avidin-HRP-al blottoltuk.

A TRPV6-ot tartalmazó mintánkat 8%-os SDS-PAGE gélen futattuk, amelyre 20 µg proteint adagoltunk. A mintákat Dunn pufferrel transzferáltuk át PVDF membránra. A membránokat egy éjszakán át blokkoltuk PBS-ben oldott 5%-os tejporoldattal. Ezután a mintákat a megfelelő primer antitestet tartalmazó (Evrogen AB233) blokkoló oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten 1,5 órán keresztül, majd háromszor mostuk PBST oldatban. A másodlagos antitest HRP konjugált antitest volt (Santa Cruz SC1616). Folyamatosan PBST-ben történő háromszori mosást végül PBS-es mosás követte, a detektálásra kemilumineszcens (ECL) módszert használtunk.

Intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mérése

Az egyes sejtek szintjén történő kalciummérés

A tranziensen transzfektált HEK-293 sejteket Fluo-3 AM (acetoxi-metilészter) (4 μ l) festékkel töltöttük fel standard extracelluláris oldatban, 45 percen át, szobahőmérsékleten. A feltöltés után a sejteket standard extracelluláris oldattal mostuk. A nominálisan Ca^{2+} -mentes oldatokat $CaCl_2$ hozzáadása nélkül készítettük. A méréseket Axiovert 200 M Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennig mikroszkóp segítségével végeztük (Carl Zeiss, Jena, Németország) 20x nagyításon (NA=0,80) DIC objektívvel. Az excitációhoz 488 nm hullámhosszúságú argon-ion lézert használtunk. A kibocsátott fény szűrését az emissziós oldalon BP 505-570 filter segítségével értük el. Az adatok regisztrálása 0,5 Hz-en történt. Az $[Ca^{2+}]_i$ változásait a kísérlet kezdetén detektálható relatív fluoreszcencia érték %-ában mutattuk be. A sejteket standard extracelluláris oldatban tartva határoztuk meg az alapfluoreszcencia értéket (100%) a ROI-k (region of interests) által kapott átlagfluoreszcencia értékből. A háttérfluoreszcenciát, mely a tárgylemez sejtmentes területén mérhető, kivontuk az alap fluoreszcens intenzitásból. Az agonistákat és az antagonistákat közvetlenül adagoltuk az oldatba a kívánt koncentrációban. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük.

Fluoreszcens intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mérés

A sejttenyészet intracelluláris kalcium koncentrációjában bekövetkező változást Fura-2-acetoxi-metilészterrel (Fura-2 AM) mértük. Az azonos tárgylemezen található transzfektált és nem-transzfektált sejteket szérumentes médiumban oldott 5 μ g/ml Fura-2 AM festékkel töltöttük fel 1 órán keresztül. A sejteket módosított, nominális kalcium-mentes Krebs-Ringer HEPES (KRH) oldatba helyeztük 20 percre. A méréseket Nikon Eclipse TiU inverz mikroszkóppal végeztük. A sejteket Nikon 40x S Fluor objektívvel vizsgáltuk. A képeket hűtött Hamamatsu Orca-EG monokróm CCD kamera segítségével készítettük. A képalkotást és az analízist SimplePCI 6.2 CImaging-gel végeztük.

FLIPR Tetra módszer

A kísérlet kezdete előtt 36 órával a lemezeket poli-D-lizinnel vontuk be, majd a sejteket tripszinezttük és 100 μ l térfogatban 40.000 sejt/lyuk sűrűségben 96-lyukú lemezre szélesztettük.

Az oldatot 36 órával később módosított Krebs oldatra cseréltük, a sejteket ebben az oldatban 1 órán át inkubáltuk 37°C-on. A sejteket 470-495 nm hullámhosszúságú LED modullal gerjesztettük, az emisszióhoz 515-575 nm-es filtereket használtunk.

A Ca^{2+} -belépés vizsgálata mangán „quench” módszer alkalmazásával

A sejteket Fura-2 AM festékkel töltöttük fel. A Fura-2 festék gerjesztésére 359 nm hullámhosszúságú fényt használtunk. MnCl_2 hozzáadása után a Mn^{2+} belépéstől függően csökken az emittált fény intenzitása. A csökkenés mértékét a görbékhez húzott érintő meredekségéből határoztuk meg. A kísérletek során a MnCl_2 -ot az EGTA-mentes oldathoz adtuk.

Elektrofiziológia

A „voltage clamp” méréseket a standard teljes sejt (whole-cell) konfigurációban végeztük, melyekhez egy Axopatch 200B erősítőt használtunk. A mikropipettákat egy P-97 Flaming-Brown típusú készülék segítségével boroszilikát üvegkapillárisokból készítettük el. A pipettahegyek ellenállása 3-6 M Ω között volt a pipettaoldat feltöltését követően. Az oldatokat folyamatos perfúzióval áramoltattuk a sejtekre. A feszültség lépcsők létrehozását és az adatgyűjtést pClamp 6.03 szoftver (Axon Instrument) segítségével végeztük.

Statisztika

A görbe alatti terület kiszámítása trapéz szabály alapján történt, melyhez SigmaPlot 12.0 szoftvert használtunk. A P2X receptor funkció meghatározásához a nem expresszáló sejtek választ kivontuk a P2X₄ receptort kifejező sejtek görbe alatti területének értékéből minden egyes tárgylemezen. Az eredményeket átlag \pm SEM formájában adtuk meg. A statisztikai feldolgozás során a parametrikus adatokat páros Student's t-próbával, míg a nem parametrikus adatokat egy változós varianciaanalízissel és Mann-Whitney U teszttel elemeztük. Az eltéréseket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$. A nem lineáris görbe meghatározásához SigmaPlot 12.0 programot használtunk.

EREDMÉNYEK

A hP2X₄ ioncsatornák vizsgálata

Sejtfelszíni biotiniláció és western blot módszerek igazolták, hogy az mCherry-vel jelölt P2X₄ fehérjék a plazmamembránon helyezkednek el. Az ATP koncentráció-függő módon (0,1-300 μ M) emelkedő maximális áram amplitúdót eredményezett a P2X₄ receptorokat expresszáló sejtekben. A P2X₄ receptort nem expresszáló sejtekben az ATP (100 μ M) nem váltott ki választ. Az ivermektin koncentrációfüggő módon potenciózta a 0,5 μ M ATP által kiváltott ionáramokat. Az adatok azt mutatják, hogy a plazmamembránban található humán P2X₄ receptorok kationpermeábilis ioncsatornaként működnek a transzfektált HEK-293 sejtekben.

A natív HEK-293 sejtekben az ATP (0,5-100 μ M) egy tranziens emelkedést váltott ki az intracelluláris kalciumkoncentrációban, míg alacsonyabb dózisban az agonista (0,1-0,25 μ M) nem okozott változást az intracelluláris kalciumszintben. Nominálisan kalcium-mentes oldatban az ATP (0,1-100 μ M) a fent leírtakhoz hasonló választ indukált. Ebből arra következtettünk, hogy a kalciumfelszabadulás az intracelluláris raktárakból történt, az így kapott kalciumjel a P2Y receptorok jelenlétének köszönhető. A P2X₄ receptorokat stabilan expresszáló sejtekben a 0,1-0,25 μ M ATP alkalmazása intracelluláris kalciumkoncentráció-változást eredményezett. Ezt a választ azonban nem tapasztaltuk nominálisan kalcium-mentes oldatban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az extracelluláris térből történt a kalcium belépés a sejtekbe. Magasabb ATP koncentráció (≥ 1 μ M) alkalmazása során azonban fenntartott kalciumjelet láttunk. A P2X₄ receptor specifikus pozitív allosztérikus modulátor ivermektin (20 μ M) potenciózta a 0,25 μ M ATP által kiváltott kalcium belépést. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az alacsony koncentrációjú ATP ($\leq 0,25$ μ M) hatására létrejött kalciumjel a P2X₄ receptorok jelenlétéhez köthető, és a P2Y receptorok nem vesznek részt ennek kialakításában. A humán P2X₄ receptorokat stabilan expresszáló HEK-293 sejteken a benzodiazepin-származék 5-BDBD (2-20 μ M) 0,25 μ M ATP jelenlétében szignifikánsan gátolta a P2X₄ receptor-mediált kalcium választ. Az 5-BDBD hasonló gátlást mutatott abban az esetben is, amikor a sejteket 0,5 μ M ATP-vel stimuláltuk. Az 5-BDBD (1-20 μ M) az ATP koncentrációtól függetlenül nem volt hatással a natív HEK-293 sejtekre. Ebből arra következtettünk, hogy az 5-BDBD nem gátolja az endogénen jelen levő P2Y receptorokat.

A P2X₄ receptorokat nem expresszáló sejtekben 0,1 μ M és 0,5 μ M ATP alkalmazása során kis amplitúdójú tranziens kalciumválaszt tapasztaltunk. A P2X₄ receptorokat expresszáló sejtekben a kalciumcsúcs 0,1 μ M és 0,5 μ M ATP hatására szignifikánsan magasabbnak bizonyult. Az ATP koncentrációjának további emelése (1 μ M) esetén jelentős emelkedést láttunk az intracelluláris kalciumcsúcs amplitúdójában, ami a P2X₄ receptorokat nem expresszáló sejtekben is megfigyelhető volt. A P2X₄ receptorokat expresszáló sejtekben azonban az 1 μ M ATP stimulálásakor keletkezett fenntartott kalciumjel nem különbözött szignifikánsan a 0,5 μ M ATP által kapott fenntartott kalcium válasz nagyságától. Mivel a P2X, valamint a P2Y receptormediált kalciumválasz aránya 0,5 μ M ATP alkalmazásánál volt a legnagyobb, a további kísérleteinkben ezt az agonistakonzentrációt választottuk az egyedi sejtek kalciumjeleinek vizsgálatára. Nominálisan kalcium-mentes oldatban csak egy tranziens kalciumjelet láttunk, ami azt bizonyítja, hogy a kalcium beáramlás a funkcionális P2X₄ receptorok jelenlétének köszönhető. A fenntartott kalciumjel további vizsgálata céljából a sejteket öt percig előkezeltük 10 μ M ivermektinnel. Ezen körülmények között az ATP-indukálta fenntartott kalcium jel szignifikánsan megemelkedett a P2X₄ receptorokat kifejező sejtekben, azonban P2X₄ receptorokat nem expresszáló sejtekben ez a változás nem volt megfigyelhető.

Megvizsgáltuk, hogy az 5-BDBD milyen hatással van a P2X₄ receptor-mediált kalciumbeáramlásra 0,5 μ M ATP jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy a fenntartott kalciumjel szignifikánsan lecsökkent. Az AUC értékek 50%-os csökkenését hozzávetőlegesen 2 μ M 5-BDBD jelenléte váltotta ki. Méréseinket a TNP-ATP gátló hatásának tanulmányozásával folytattuk. A TNP-ATP 0,5 μ M ATP jelenlétében koncentrációfüggő módon gátolta a fenntartott kalciumjelet. Ezekből az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy mind az 5-BDBD, mind a TNP-ATP gátolják az ATP indukált kalciumjelet a hP2X₄ receptorokat tranziensen expresszáló sejtekben.

Megvizsgáltuk az 5-BDBD gátló hatását HEK-293 sejtekben, a patch clamp technika teljes sejt konfigurációjában. Ezen kísérleti körülmények között azt találtuk, hogy az 5-BDBD koncentráció-függő módon gátolta a P2X₄ receptor-mediált befelé irányuló ionáramokat. Az 5-BDBD 2 μ M és 20 μ M-os koncentrációban az ATP dózis-hatás görbét jobbra tolta. Tekintettel arra, hogy a maximális áram nagysága nem változott, arra következtettünk, hogy az 5-BDBD kompetitív módon gátolta a P2X₄ receptorokat.

A humán TRPV6 ioncsatornák vizsgálata

A hTRPV6 expressziójának kimutatására western blot technikát és biotinizációs eljárást használtunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a hTRPV6 fehérje csak a transzfektált HEK-293 klónokban van jelen, natív HEK-293 sejtekben nem expresszálódik a fehérje. Biotinizációval végzett kísérletek igazolják, hogy a hTRPV6 fehérje a plazmamembránban helyezkedik el.

A következőkben a hTRPV6 csatornán keresztüli kalcium transzportot vizsgáltuk. Nominálisan kalcium-mentes oldatban nem találtunk különbséget a kiindulási intracelluláris kalcium koncentrációban a kontroll és hTRPV6 fehérjével tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek között. Abban az esetben azonban, ha 1 mM kalciumot adtunk az extracelluláris oldathoz, egy jelentős tranziens emelkedést követően az intracelluláris kalciumkoncentráció magasabb szinten stabilizálódott a transzfektált sejtekben. Ebből arra következtethetünk, hogy a hTRPV6 kalciumpermeábilis ioncsatorna.

Munkánk folytatásaként a belső kalciumraktárak által vezérelt plazmamembrán Ca^{2+} csatornák gátlószerének, a 2-APB-nek a hatását vizsgáltuk a hTRPV6 csatornákon. Nominális kalcium-mentes oldatban a 2-APB nem befolyásolta az intracelluláris kalciumszintet sem a kontroll, sem a hTRPV6 fehérjét expresszáló sejtekben. Extracelluláris kalcium jelenlétében a 2-APB mindkét sejtcsoportban szignifikánsan gátolta a kalcium beáramlást.

A mangánbeáramlás a transzfektált sejtekben szignifikánsan intenzívebb volt, mint a kontroll sejtekben. Következésképpen, ez a módszer alkalmas a 2-APB hTRPV6 fehérjére gyakorolt hatásának vizsgálatára. A sejtek 2-APB-vel történt előkezelését követően szignifikánsan csökkent a Mn^{2+} beáramlás mértéke, amely a hTRPV6 fehérje gátlására utal.

KÖVETKEZTETÉSEK

Szubmikromoláris ATP koncentráció alkalmazása esetén, a citoszólikus kalcium koncentráció mérése megbízható módszernek bizonyult a P2X receptor antagonisták farmakológiai tulajdonságainak vizsgálatára HEK-293 sejtekben. Az 5-BDBD és a TNP-ATP hasonló mértékben gátolják a humán rekombináns P2X₄ receptorokat, azonban a hatásmechanizmusuk különböző. Az 5-BDBD az ATP dózishatás görbét jobbra tolta, miközben a maximális stimuláció nagysága nem változott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az 5-BDBD valószínűleg kompetitív gátlószere a humán P2X₄ receptoroknak.

A humán TRPV6 fehérjék konstitutívan nyitott, divalens kationokra permeábilis ioncsatornaként viselkednek. A hTRPV6 ioncsatornák megbízható, de nem specifikus gátlószere a 2-APB. A 2-APB ugyanabban a koncentrációtartományban gátolja a raktár által vezérelt kalcium csatornákat és a hTRPV6 ioncsatornákat. Mindazonáltal eredményeink nem teszik lehetővé annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy a hTRPV6 ioncsatornák részét képezik-e a belső raktár vezérelt Ca²⁺ csatornának. A 2-APB és hasonló struktúrájú vegyületek fontos szerepet tölthetnek be a hTRPV6 csatornák farmakológiai gátlásában.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

X. 1. Az értekezés alapját képező publikációk

Balázs B, Dankó T, Kovács G, Köles L, Hediger MA, Zsembery A. Investigation of the inhibitory effects of the benzodiazepine derivative, 5-BDBD on P2X₄ purinergic receptors by two complementary methods. *Cell Physiol Biochem*. 2013,32(1):11-24.

IF.:3,415

Kovacs G, Montalbetti N, Simonin A, Danko T, **Balazs B**, Zsembery A, Hediger MA. Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell Calcium*. 2012 Dec;52(6):468-80.

IF.:4,327

X. 2. Egyéb publikációk

Gönczi M, Birinyi P, **Balázs B**, Szentandrassy N, Harmati G, Könczei Z, Csernoch L, Nánási PP. Age-dependent changes in ion channel mRNA expression in canine cardiac tissues. *Gen Physiol Biophys*. 2012 Jun;31(2):153-62.

IF.:0,852

Kovacs G, Danko T, Bergeron MJ, **Balazs B**, Suzuki Y, Zsembery A, Hediger MA. Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. *Cell Calcium*. 2011 Jan;49(1):43-55.

IF.:3,766